



(19) RU⁽¹¹⁾ 2 207 376⁽¹³⁾ C2
(51) МПК⁷ C 12 P 13/04, C 12 N 1/21,
15/52, 15/70// (C 12 N 1/21, C 12 R
1:19)

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 99121636/13, 14.10.1999
(24) Дата начала действия патента: 14.10.1999
(46) Дата публикации: 27.06.2003
(56) Ссылки: J. Biol. Chem. - 1973, vol. 248,
№17, p. 6062-6070. DE 19831609 A1, 15.04.1999.
(98) Адрес для переписки:
129010, Москва, ул.Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Н.Г.Лебедевой, рег.№ 0112

(71) Заявитель:
Закрытое акционерное общество
"Научно-исследовательский институт
Аджиномото-Генетика"
(72) Изобретатель: Гусятинер М.М.,
Козлов Ю.И., Птицын Л.Р., Альтман
И.Б., Ворошилова Э.Б., Йомантас Юргис
Антанас Владович, Ямпольская Т.А.
(73) Патентообладатель:
Закрытое акционерное общество
"Научно-исследовательский институт
Аджиномото-Генетика"

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ L-АМИНОКИСЛОТЫ МЕТОДОМ ФЕРМЕНТАЦИИ, ШТАММ БАКТЕРИИ
ESCHERICHIA COLI - ПРОДУЦЕНТ L-АМИНОКИСЛОТЫ (ВАРИАНТЫ)

(57)
Изобретение относится к биотехнологии.
L-Аминокислоты, такие как L-треонин,
L-гомосерин, L-метионин, L-аргинин,
L-пролин, L-изолейцин или L-глутаминовая
кислота, получают культивированием
бактерии Escherichia coli,
трансформированной геном, кодирующим
пируваткарбоксилазу. Причем E. coli обладает
способностью к продукции L-аминокислот.
После накопления L-аминокислот их

извлекают из питательной среды. Штамм
бактерии E. coli MG 442 или 44
трансформируют плазмидой, содержащей
ген, кодирующий пируваткарбоксилазу. В
первом случае штамм продуцирует L-треонин
и L-глутаминовую кислоту, в последнем -
L-гомосерин. Изобретение позволяет
получать L-аминокислоты с высокой степенью
эффективности. 3 с. и 2 з.п.ф-лы, 3 ил., 1
табл.

RU 2 207 376 C2

RU 2 207 376 C2



RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 207 376** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **C 12 P 13/04, C 12 N 1/21,**
15/52, 15/70/(C 12 N 1/21, C 12 R
1:19)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 99121636/13, 14.10.1999
(24) Effective date for property rights: 14.10.1999
(46) Date of publication: 27.06.2003
(98) Mail address:
129010, Moskva, ul.B.Spasskaja, 25, str.3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i
Partnery", pat.pov. N.G.Lebedevoj, reg.№ 0112

(71) Applicant:
Zakrytoe aktsionernoe obshchestvo
"Nauchno-issledovatel'skij institut
Adzhinomoto-Genetika"
(72) Inventor: Gusjatiner M.M.,
Kozlov Ju.I., Ptitsyn L.R., Al'tman
I.B., Voroshilova Eh.B., Jomantas Jurgis
Antanas Vladovich, Jampol'skaja T.A.
(73) Proprietor:
Zakrytoe aktsionernoe obshchestvo
"Nauchno-issledovatel'skij institut
Adzhinomoto-Genetika"

(54) **METHOD FOR PREPARING L-AMINO ACID BY FERMENTATION METHOD, STRAIN OF BACTERIUM ESCHERICHIA COLI AS PRODUCER OF L-AMINO ACID (VARIANTS)**

(57) Abstract:
FIELD: biotechnology, microbiology, genetic engineering, biochemistry, amino acids. SUBSTANCE: method involves to preparing L-amino acids as such L-threonine, L-homoserine, L-methionine, L-arginine, L-proline, L-isoleucine or L-glutamic acid by culturing the microorganism Escherichia coli transformed with gene encoding enzyme pyruvate carboxylase being this strain E. coli shows ability to produce L-amino acids. Accumulated L-amino acids are extracted from

nutrient medium. The strain of bacterium E. coli MG 442 or 44 is transformed with plasmid comprising the gene encoding the enzyme pyruvate carboxylase. By the first variant the strain produces L-threonine or L-glutamic acid and by the latter variant L-homoserine. Invention provides the high effectiveness of production of L-amino acids. EFFECT: improved preparing method, valuable properties of strain. 5 cl, 3 dwg, 1 tbl, 3 ex

Настоящее изобретение относится к способу получения L-аминокислот, а именно к способу получения L-треонина, L-глутаминовой кислоты, L-гомосерина, L-метионина, L-аргинина, L-пролина или L-изолейцина с использованием бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia*.

Такие L-аминокислоты, как L-треонин и L-глутаминовая кислота, обычно производятся методами ферментации с использованием преимущественно кориноформных бактерий, принадлежащих роду *Brevibacterium*, *Corynebacterium* и *Microbacterium* или их мутантным разновидностям ("Amino Acid Fermentation", Gakkai Shuppan Center, p. 195-215, 1986).

С другой стороны, известен метод выведения бактерий, производящих L-аминокислоты и принадлежащих роду *Escherichia*, с помощью техники генетической рекомбинации.

Например, был открыт метод получения L-лизина с помощью *Escherichia coli*, в которой гены, кодирующие дигидродипико-линатсинтетазу и аспартокиназу, утратили чувствительность к ингибированию по типу отрицательной обратной связи L-лизином и L-треонином, а гены, кодирующие диаминопимелатдегидрогеназу (или тетрагидродипиколонатсукцинилразу и сукцинилдиаминопимелатдеацилазу), обладали повышенной активностью (WO 95/16042).

Хотя продукция L-аминокислот была значительно усовершенствована выведением микроорганизмов, указанных выше, или улучшением процессов производства, необходимо разрабатывать более эффективные процессы получения L-аминокислот, чтобы удовлетворить ожидаемое в будущем существенное повышение спроса на аминокислоты.

Пируваткарбоксилаза [пируват: диоксид углерода лигаза (ADP-образующая), EC 6.4.1.1] является ферментом, содержащим биотин. Она катализирует карбоксилирование пирувата с образованием оксалоацетата. Пируваткарбоксилаза из *Escherichia coli* неизвестна, но *Brevibacterium* (Diesterhaft M.D. and Freese E., J. Biol. Chem., 248, No. 17, p. 6062-6070 (1973)) и *Corynebacterium* (Peters-Wendish P.G. et al., Microbiology, 144, p. 915-927 (1988)) содержат пируваткарбоксилазу, и нуклеотидная последовательность генов, кодирующих этот фермент, была опубликована.

Кроме того, известны штаммы *Corynebacterium glutamicum*, в которых активность пируваткарбоксилазы увеличена, или штаммы *Corynebacterium glutamicum*, ген пируваткарбоксилазы которых инактивирован (Peters-Wendish, P.G. et al., Microbiology, 144, p. 915-927 (1988)). Однако эти микроорганизмы были созданы в качестве экспериментальных образцов для изучения ферментов, необходимых для роста на среде с глюкозой. Связь между активностью пируваткарбоксилазы и продукцией L-аминокислот была неизвестна. Также неизвестны попытки введения гена пируваткарбоксилазы в бактерии, принадлежащие роду *Escherichia*.

Настоящее изобретение выполнено на

основе вышеупомянутых фактов, и его целью является разработка способа получения L-аминокислот, а именно L-треонина, L-глутаминовой кислоты, L-гомосерина, L-метионина, L-аргинина, L-пролина, L-изолейцина, с высокой степенью эффективности.

В результате кропотливого исследования с целью достижения указанной выше цели авторами настоящего изобретения было установлено, что введение гена, кодирующего пируваткарбоксилазу (здесь и далее упоминающегося как "ген рус"), в бактерию, принадлежащую роду *Escherichia*, может усилить продукцию бактерией L-аминокислот. Таким образом было совершено настоящее изобретение.

То есть предметом настоящего изобретения является бактерия, принадлежащая роду *Escherichia*, трансформированная с помощью гена, кодирующего пируваткарбоксилазу, и обладающая способностью продукции L-аминокислот.

В настоящем изобретении также представлена бактерия, описанная выше, в которой ген, кодирующий пируваткарбоксилазу, получен из бактерии, принадлежащей роду *Bacillus*.

Далее, в настоящем изобретении предложена бактерия, описанная выше, в которой ген, кодирующий пируваткарбоксилазу, введен в названную бактерию в малом числе копий.

Более того, в настоящем изобретении предложена бактерия, описанная выше, в которой L-аминокислота выбрана из группы, состоящей из L-треонина, L-глутаминовой кислоты, L-гомосерина, L-метионина, L-аргинина, L-пролина и L-изолейцина.

Также в настоящем изобретении предложен способ получения L-аминокислот, включающий в себя культивирование указанной выше бактерии в среде, производство и накопление в среде L-аминокислот и выделение L-аминокислот из среды.

Далее, в настоящем изобретении представлен способ получения L-аминокислот, описанный выше, в котором L-аминокислота выбрана из группы, состоящей из L-треонина, L-глутаминовой кислоты, L-гомосерина, L-метионина, L-аргинина, L-пролина и L-изолейцина.

Термин "продукция L-аминокислот" означает способность бактерии продуцировать и накапливать L-аминокислоту в среде в количестве, большем, чем у дикого штамма этого типа.

В соответствии с настоящим изобретением продукция L-аминокислоты, такой как L-треонин, L-глутаминовая кислота, L-гомосерин, L-метионин, L-аргинин, L-пролин или L-изолейцин, бактерией, принадлежащих к роду *Escherichia*, может быть улучшена. Более того, настоящее изобретение может быть использовано для выведения продуцентов L-аминокислот, принадлежащих роду *Escherichia*.

На фиг. 1 показана схема получения штамма-реципиента *Bacillus subtilis* русA::KmR для клонирования гена русA.

На фиг.2 показана схема русA из *Bacillus subtilis* 168.

На фиг.3 показана схема конструирования

плазмиды, содержащей ген *rusA*.

Далее настоящее изобретение будет описано подробнее.

<1> Бактерия, принадлежащая роду *Escherichia*, трансформированная с помощью гена *rus*.

Бактерия, принадлежащая роду *Escherichia*, согласно настоящему изобретению является бактерией, трансформированной с помощью гена *rus*. Примером бактерии, принадлежащей роду *Escherichia*, является *Escherichia coli*. Хотя ген *rus*, используемый в настоящем изобретении, не ограничивается тем условием, что он может кодировать белок с активностью пируват-карбоксилазы, примерам гена *rus* может служить ген *rus*, полученный из бактерии, принадлежащей к роду *Bacillus*, или ген *rus* из коринеподобных бактерий. Была опубликована нуклеотидная последовательность гена *rus*, полученного из *Bacillus subtilis*, (Genbank/EMBL/DBJ Accession, Z97025, NID g2224758) и гена *rus* из *Corynebacterium Glutamicum* (Peters-Wendish P. G. et al., Microbiology, 144, p. 915-927 (1988)). Поэтому ген *rus* может быть получен с помощью ПЦР (полимеразной цепной реакции: White T. J. et al., Trends Genet., 5, 185 (1989)) с применением праймеров (затравок), синтезированных в соответствии с нуклеотидной последовательностью, и с использованием в качестве матрицы хромосомной ДНК бактерии, принадлежащей роду *Bacillus*, такой как *Bacillus subtilis*, или бактерии *coryneform*, такой как *Corynebacterium Glutamicum*.

Штамм *Escherichia coli* 44/pmMW119-*rusA*, в котором присутствует pmMW119-*rusA*, содержащий ген *rus* *Bacillus subtilis* был депонирован в Российской национальной коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ), ВНИИГенетика; Дорожный проезд, 1, 113545, Москва, Россия, под регистрационным номером ВКПМ В-7822.

Штамм *Escherichia coli* MG442/pmMW119-*rusA*, в котором присутствует pmMW119-*rusA*, содержащий ген *rus* *Bacillus subtilis*, был депонирован в Российской национальной коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ), ВНИИГенетика; Дорожный проезд, 1, 113545, Москва, Россия, под регистрационным номером ВКПМ В-7821.

В этой связи ген, кодирующий пируваткарбоксилазу из *Bacillus subtilis* (ген *rusA*), был клонирован, как это описано ниже, в процессе выполнения настоящего изобретения.

Сначала был сконструирован штамм *Bacillus subtilis*, дефицитный по гену *rusA*. Затем, с использованием этого штамма в качестве реципиента, ген *rusA* был клонирован посредством выделения фрагмента ДНК, который способствовал восстановлению аутотрофности штамма по аспартату или цитрату, из библиотеки геномной ДНК штамма *Bacillus subtilis* дикого типа. После того как *Bacillus subtilis* образует оксалоацетат с помощью пируваткарбоксилазы, *Bacillus subtilis* не может расти на минимальной среде, если у нее наблюдается дефицит активности этого фермента. Однако рост восстанавливается при добавлении L-аспартата, L-глутамата,

цитрата или сукцината. Нуклеотидная последовательность гена *rusA* и аминокислотная последовательность, закодированные геном, показаны в SEQ ID Nos:3 и 4.

Штамм, дефицитный по гену *rusA*, может быть получен, например, как описано ниже. Частичный фрагмент ДНК гена *ylaP*, расположенный на хромосоме сразу после гена *rusA*, был получен с помощью ПЦР. В качестве затравок для ПЦР могут быть использованы олигонуклеотиды, например SEQ ID Nos:1 и 2. Затем штамм *Bacillus subtilis* дикого типа был трансформирован с помощью ДНК-плазмиды, содержащей полученный ДНК и маркерный ген, с последующей интеграцией ДНК-плазмиды в ген *ylaP* в составе хромосомной ДНК методом гомологичной рекомбинации. Затем, с помощью фермента рестрикции, например, такого как *Pst*I, узнающего рестрикционный сайт внутри гена *rusA*, была сконструирована библиотека хромосомной ДНК полученного штамма. Рекомбинантная плазмида, содержащая маркерный ген и частичный фрагмент гена *rusA*, может быть получена трансформацией штамма *Bacillus subtilis* дикого типа с помощью библиотеки и последующим отбором клонов, экспрессирующих маркерный ген. Затем штамм *Bacillus subtilis* дикого типа был трансформирован линеаризованной рекомбинантной плазмидой, и клоны, экспрессирующие маркерный ген, были отобраны для получения дефицитного по гену *rusA* штамма, в котором ДНК-плазмида интегрирована в ген *rusA* в хромосомной ДНК этого штамма.

Трансформация бактерии, принадлежащей роду *Escherichia*, геном *rus* может быть произведена путем введения гена *rus*, в подходящий вектор, который функционирует в бактерии, принадлежащей роду *Escherichia*, чтобы сконструировать рекомбинантный вектор, и введения этого рекомбинантного вектора в бактерию, принадлежащую роду *Escherichia*.

В качестве примера вектора может служить плазмида pBR322, pmW118, pmW119, pUC18, pUC19 или подобная, фаговый вектор, такой как λ , λ , M13mp9 или подобный, и транспозон, такой как Mu, Tn10, Tn 5 или подобный. Однако в настоящем изобретении плазмида с малым числом копий, такая как pmW118 или pmW119, предпочтительна в виду того, что бактерия, трансформируемая вектором, может быть нестабильной, если в качестве вектора для введения гена *rusA* используется плазмида с высоким числом копий.

Введение ДНК в бактерию рода *Escherichia* может быть произведено, например, по методу D.M. Morrison (Methods in Enzymology, 68, h. 326 (1979)) или по методу, в котором бактериальные клетки, включающие ДНК, для увеличения их проницаемости для ДНК обрабатываются хлоридом кальция (Mandel M. and Higa A. , J. Mol. Biol., 53, p. 159 (1970)) или другим сходным способом.

Приготовление геномной ДНК, конструирование библиотеки геномной ДНК, гибридизация, ПЦР, приготовление ДНК-плазмиды, разрезание и лигирование ДНК, трансформация и тому подобное могут

быть произведены любым способом, известным специалисту, имеющему навыки и опыт работы в этой области. Такие способы описаны Sambrook J., Fritzsche E.F., Maniatis T. (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.21 (1989)).

Продукция L-аминокислот бактерией рода *Escherichia* может быть улучшена путем придания или усиления активности пируваткарбоксилазы в бактерии путем трансформации этой бактерии геном рус. Это происходит, вероятно, из-за того, что щавелевоуксусная кислота образуется не только из фосфоенолпировиноградной кислоты, но также из пировиноградной кислоты. А именно, транспорт молекулы глюкозы (или сахарозы) в бактериальную клетку, опосредованный системой фосфоенолпировиноградной кислоты, протекает с расходом одной молекулы фосфоенолпировиноградной кислоты и образованием одной молекулы пировиноградной кислоты. И хотя образовавшаяся пировиноградная кислота не участвует напрямую в синтезе L-аминокислот в бактериальной клетке, продукция L-аминокислот может быть повышена вследствие образования щавелевоуксусной кислоты из пировиноградной кислоты.

В качестве бактерии, принадлежащей роду *Escherichia*, в которую ген рус должен быть введен, для производства L-аминокислот использован штамм, уже обладающий этим свойством. Или же способность к продукции L-аминокислот бактерией рода *Escherichia* может быть придана в результате ее трансформации геном рус. Кстати ген рус из *Escherichia coli* неизвестен, однако, если этот ген будет найден в дальнейшем, он также может быть использован.

Примеры бактерий, принадлежащих роду *Escherichia* и производящих L-аминокислоты, описаны ниже.

(1) Бактерии, продуцирующие L-треонин.

Примером бактерий, продуцирующих L-треонин, принадлежащих роду *Escherichia*, может служить штамм MG442 (был депонирован в Российской национальной коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ), ВНИИГенетика; Дорожный проезд, 1, 113545, Москва, Россия, под регистрационным номером ВКПМ В-1628 (VKPM В-1628) (USP 4, 278, 765; Гусятинер М.М. и др., Генетика, 14, с. 947-956, (1978)). Штамм MG442 был получен как мутант, устойчивый к 2-амино-3-гидроксивалериановой кислоте - аналогу L-треонина. Этот штамм также был неполным (leaky type) аукоотрофом по изолейцину. Он продуцировал L-треонин и L-глутамат в качестве побочных продуктов.

В качестве альтернативы штамм MG442, трансформированный pVC40 (USP 5, 175, 107), предпочтительно может быть использован в качестве штамма, продуцирующего L-треонин.

(2) Бактерии, продуцирующие L-гомосерин.

Примером бактерий, продуцирующих L-гомосерин, принадлежащих роду *Escherichia*, может служить штамм 44 (thrB). Этот штамм был получен из известного ранее штамма C600 (thrB, leuB) (Appleyard R.K., Genetics, 39, p. 440-452) как Leu⁺-ревертант. Штамм 44, трансформированный с помощью

плазмиды, содержащей ген thrA, кодирующий аспараткиназу - гомосериндегидрогеназу I, может быть предпочтительно использован.

Штамм *Escherichia coli* 44 был депонирован в Российской национальной коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ), ВНИИГенетика; Дорожный проезд, 1, 113545, Москва, Россия, под регистрационным номером ВКПМ В-2175.

(3) Бактерии, продуцирующие L-глутаминовую кислоту.

Примером бактерий, продуцирующих L-глутаминовую кислоту, принадлежащих роду *Escherichia*, может служить штамм, устойчивый к L-валину, например штаммы *Escherichia coli* B11, K-12 (ATCC10798), B (ATCC11303) и W (ATCC9637).

(4) Бактерии, продуцирующие L-изолейцин.

Примером бактерий, продуцирующих L-изолейцин, принадлежащих роду *Escherichia*, может служить штамм TDH6/pVIC40, pMWD5 (Hashiguchi K. et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 63(4), p. 672-679 (1999) или AJ12919, описанный в EPO 685555A1.

<2> Способ получения L-аминокислот.

Продуцирование L-аминокислот может происходить с высокой эффективностью при культивировании бактерии, принадлежащей роду *Escherichia*, трансформированной геном рус, как это описано выше, и обладающей способностью к продукции L-аминокислот в соответствующей питательной среде, при продуцировании и накоплении L-аминокислот в питательной среде и сборе L-аминокислот из питательной среды.

Примером L-аминокислот может служить L-треонин, L-глутаминовая кислота, L-гомосерин, L-метионин, L-аргинин, L-пролин и L-изолейцин. L-Аминокислоты могут производиться с помощью способа согласно настоящему изобретению как по отдельности, так и в смеси из двух и более аминокислот разного вида.

В способе согласно изобретению выращивание бактерии, принадлежащей роду *Escherichia*, накопление, выделение L-аминокислот из жидкой питательной среды и их очистка могут быть произведены способом, сходным с общепринятыми способами получения аминокислот методом ферментации с использованием бактерий. Питательная среда, используемая для культивирования, может быть как искусственной, так и натуральной, при условии, что она содержит источники углерода и азота, минеральные вещества и, если необходимо, питательные вещества, требующиеся для роста бактерий в соответствующем количестве. В качестве источников углерода могут быть использованы различные углеводы, такие как глюкоза и сахароза, а также различные органические кислоты. В зависимости от усваиваемой способности используемой бактерии может быть использован спирт, такой как этанол, и глицерин. В качестве источника азота могут быть использованы аммиак, различные соли аммония, такие как сульфат аммония, другие источники азота, такие как амины, природные источники азота, такие как пептон, гидролизат соевых бобов, ферментализат микробной биомассы. В качестве минеральных веществ могут быть

использованы фосфат калия, сульфат магния, хлорид натрия, сульфат железа, сульфат марганца, карбонат кальция.

Выращивание осуществлял предпочтительно в аэробных условиях, таких как качалочная культура, а также при аэрации и перемешивании. Температура культуры обычно устанавливается в интервале от 20 до 40°C, предпочтительно в интервале от 30 до 38°C. pH среды обычно устанавливается в интервале от 5 до 9, предпочтительно в интервале от 6,5 до 7,2. pH культуральной среды может быть отрегулирован с помощью аммония, карбоната кальция, различных кислот, оснований и буферов. Обычно культивирование в течение 1-3 суток приводит к накоплению целевых L-аминокислот в питательной среде.

Сбор и очистка L-аминокислоты после культивирования могут быть произведены путем удаления из среды нерастворимых компонентов, таких как клетки, путем центрифугирования или фильтрации через мембрану с последующей очисткой на ионообменнике, концентрированием и кристаллизацией.

Наилучший способ осуществления настоящего изобретения

Настоящее изобретение будет более подробно проиллюстрировано ниже со ссылкой на примеры.

Пример 1. Клонирование гена *rusA* штамма *Bacillus subtilis* 168.

<1> Конструирование штамма реципиента *B. subtilis* *rusA::Km^R* для клонирования.

Штамм реципиент *B. subtilis* был сконструирован при помощи инсерционного мутагенеза гена *rusA*. Фрагмент гена *rusA* был клонирован в две стадии (см. фиг.1 и 2).

Одна из рамок считывания (*ylsP*) в базе данных проекта определения последовательности генома *Bacillus subtilis* была охарактеризована как ген *rusA*, кодирующий пируваткарбоксилазу. Область, расположенная сразу после терминатора гена *rusA*, была получена с помощью ПЦР с использованием следующей пары олигонуклеотидов:

5'-GATATAAGGGGACTTCAGAG и

5'-GGCGCXXXATGCGXXXCAATC.

Концы полученного фрагмента ДНК длиной 269 п.н. были затуплены с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I, и фрагмент клонирован в сайт *ScaI* плазмиды *pBR322* штамма *E. coli*. Полученная плазмида *pBRPYCA11* была подвержена перевариванию под действием *SalI* и лигирована с фрагментом ДНК длиной 1628 п. н. , содержащим ген *cat*, полученным после переваривания плазмиды *pC194* с помощью *SalI*. Затем штамм *Bacillus subtilis* 168 *trpC2* был трансформирован полученной плазмидой *pBRYCA11Cm^R3*, и клоны *Cm^R* были отобраны. Плазмида *pBRYCA11Cm^R3* не может самопроизвольно воспроизводиться при клеточном делении бактерии, принадлежащей роду *Bacillus*, но может встраиваться в хромосому рядом с геном *rusA* ввиду гомологии с фрагментом ДНК длиной 269 п.н. Штамм был назван *B. subtilis trpC2 huz::pBRPYCACm^R3*. Интегрант содержал репликон *pBR322*, обуславливающий устойчивость к тетрациклину ген *tet*, полученный из *pBR322*, и маркер *Cm^R*.

Хромосомная ДНК штамма *B. subtilis trpC2 huz::pBRPYCACm^R3* была выделена и использована для клонирования дистальной части гена *rusA*. Обработанная с помощью *PstI* хромосомная ДНК была самолигирована и трансформирована в штамм *E. coli* TG1. Затем были отобраны клоны с рекомбинантными плазмидами, устойчивые к тетрациклину и хлорамфениколу. Из одного клона была выделена плазмида и названа *pPYCl*. Плазмида *pPYCl* содержала единственный сайт, подверженный рестриктазе *BglII*, расположенный внутри гена *rusA*. Этот сайт был использован для включения фрагмента ДНК длиной 1818 п.н., содержащего маркер устойчивости *B. subtilis* к канамицину. Для получения плазмиды *pPYCl::Km^R* плазмида *pPYCl* была обработана рестриктазой *BglII* и лигирована с *pUC7Km^R*, предварительно обработанной рестриктазой *BamHI*.

Инактивация гена *rusA* в штамме дикого типа *B. subtilis* 168 *trpC2* была произведена в одну стадию при трансформации этого штамма линеаризованной плазмидой *pPYCl::Km^R* с последующим отбором на бульоне Лурия (Luria) с добавлением канамицина. С помощью гомологичной рекомбинации по типу двойного кроссинговера *Km^R* был введен в ген *rusA* хромосомной ДНК.

Сконструированный штамм *B. subtilis rusA::Km^R trpC2* не был способен к росту на минимальной среде Спизайзена (Spizizen) (Anagnostopoulos C. and Spizizen J., J.Bacteriol., 81, p. 741-746 (1961)), содержащей триптофан, до тех пор пока не были добавлены цитрат или аспартат.

Состав минимальной среды Спизайзена, г/л:

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ - 18,3

KH_2PO_4 - 6,0

$(NH_4)_2SO_4$ - 2,0

Цитрат натрия - 1,2

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2

Глюкоза - 10,0

pH - 7,0

Штамм *B. subtilis trpC2 rusA::Km^R recE::Tc^R* был сконструирован путем переноса инактивированного аллеля гена *recE* штамма *Bacillus subtilis recE::Tc^R* с помощью фага E40 (фиг.2). Было необходимо инактивировать рекомбинацию в штамме-реципиенте, предназначенном для клонирования гена *rusA* *B. subtilis*. Для клонирования гена *rusA* был использован полученный штамм *B. subtilis trpC2 rusA::Km^R recE::Tc^R*.

<2> Клонирование природного гена *rusA* *B. subtilis* методом комплементации.

Ген *rusA* был клонирован из штамма *B. subtilis* 168 *trpC2*. Хромосомная ДНК, выделенная из штамма 168 *trpC2*, была частично переварена *EcoRI* и лигирована с предварительно обработанной с помощью *EcoRI* *pCB20 (Em^R)* (любезно предоставленной д-ром Ю.Йомантасом, см. "Genetic transformation and expression" L.O. Butler et al eds., Intercert Ltd., PO Box 402, Wimborne, Dorset, BH229T2, UK, 1989, p. 269-281 (1989)). Затем штамм *trpC2 rusA::Km^R recE::Tc^R* был трансформирован лигирующей смесью (фиг.2). Клоны *Asp^R*, *Em^R*, *Km^R* были отобраны на минимальной

среде Сплицайзена без добавления цитрата или аспартата в присутствии триптофана, эритромицина и канамицина. Плазмида рPYCRS, присутствующая в одном из отобранных клонов, дополненных мутацией в гене *rusA*, имела предсказанную структуру, и подтвердила тот же фенотип Asp^+ , Em^R после вторичной трансформации.

<3> Клонирование фрагмента ДНК, содержащего ген *rusA* штамма *B. subtilis* 168 trpC2, в плазмиды pUC18 и pUC19 с высоким числом копий.

Плазмида рPYCR3 была переварена рестриктазами HindII и ScaI, и полученный HindII-ScaI фрагмент длиной 4414 п.н., содержащий ген *rusA* с 5'-концевой нетранспируемой последовательностью, включающей в себя промотор и сайт связывания рибосомы, был клонирован в плазмиду pUC18-*rusA*, переваренную SmaI. Таким образом была получена плазмида pUC18-*rusA* (фиг.3, сверху). Реакция лигирования была проведена следующим подробно описанным способом. 90 нг плазмиды pUC18, переваренной SmaI, и 300 нг очищенного методом электрофореза в агарозном геле HindII-ScaI фрагмента длиной 4414 п.н., содержащего ген *rusA*, были лигированы с помощью T4 ДНК-лигазы (2 единицы активности) (Pharmacia, Sweden) в 45 мкл реакционной смеси, содержащей 1-кратный буфер One-Phor-All (Pharmacia, Sweden) и 1мМ АТФ.

Штамм *E. coli* TG1 был трансформирован плазмидой pUC18-*rusA*. Полученные после трансформации клоны анализировали с помощью эндонуклеаз KpnI, XbaI, BamHI, HindIII, EcoRI. Все клоны содержали ген *rusA* в обратной ориентации по отношению к промотору *lac* плазмиды pUC18. Однако гены *rusA*, клонированные в pUC18, могут быть экспрессированы под контролем внутреннего промотора этого гена.

Далее, для того чтобы переставить ген *rusA* под контроль промотора *lac*, KpnI-XbaI фрагмент pUC18-*rusA* был клонирован в pUC19, расщепленную с помощью KpnI и XbaI. Однако полученные клоны не были стабильными и отторгали плазмиду после небольшого (6-8 часов) промежутка времени в процессе культивирования.

<4> Клонирование фрагмента ДНК, несущего ген *rusA* в плазмиду рMW119 с низким числом копий.

KpnI-XbaI-фрагмент pUC18-*rusA* был лигирован в плазмиду рMW119 с низким числом копий, предварительно расщепленную с помощью KpnI и XbaI (фиг.3, снизу). Реакция лигирования проводилась в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 60 нг рMW119, переваренной с помощью KpnI и XbaI, 120 нг KpnI-XbaI-фрагмента pUC18-*rusA*, очищенного методом электрофореза в агарозном геле, 1-кратный буфер One-Phor-All (Pharmacia, Sweden), 1 мМ АТФ и T4-ДНК-лигазу (1 единица активности) (Pharmacia, Sweden).

Штамм *E. coli* TG1 был трансформирован с помощью лигирующей смеси. Полученные трансформанты анализировали с помощью SacI, KpnI, XbaI, BamHI, HindIII, EcoRI. Все клоны содержали ген *rusA*, находящийся под контролем промотора *lac* плазмиды рMW119 и его собственного промотора. Полученный таким образом клон был назван TG1

(рMW119-*rusA*). Из этого клона была получена плазмида рMW119-*rusA*.

Пример 2. Продукция L-треонина и L-глутаминовой кислоты.

Штамм *E. coli* MG442 был трансформирован с помощью плазмиды рMW119-*rusA*, и 10 клонов Amp^r были отобраны. Способность этих клонов продуцировать L-треонин и L-глутаминовую кислоту была проверена в следующей ферментационной среде.

Состав ферментационной среды, г/л:

Глюкоза - 60,0

$(NH_4)_2SO_4$ - 1,5

KH_2PO_4 - 1,5

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 1,0

L-Изолейцин, мг/л - 10,0

Тиамин, мг/л - 0,1

$CaCO_3$ (стерилизованный отдельно) - 20,0

Ферментация проводилась в пробирках (20 x 300 мм) при 32°C в течение 72 часов на роторной качалке. Одна петля каждого из 10 клонов была высеяна в пробирку, содержащую 2,0 мл среды. В качестве контроля были использованы 10 отдельных колоний штамма без плазмиды. Концентрации L-треонина и L-глутаминовой кислоты после ферментации были измерены с помощью тонкослойной хроматографии. Результаты измерений приведены в таблице.

Пример 3. Продукция L-гомосерина.

L-Гомосеринпродуцирующий штамм 44 *E. coli* был трансформирован плазмидой рMW119-*rusA*, и было получено пять резистентных к ампициллину клонов. Анализ продукции L-гомосерина проводили, как указано в примере 1, но ферментационную среду при этом дополняли 0,5 г/л L-треонина. В качестве контроля использовали пять колоний штамма 44, не содержащих плазмиду. После ферментации средние концентрации L-гомосерина составляли 4,5 г/л (штамм 44) и 5,7 г/л (штамм 44 с плазмидой рMW119-*rusA*).

Формула изобретения:

1. Способ получения L-аминокислоты, где L-аминокислота представляет собой L-треонин, L-глутаминовую кислоту, L-гомосерин, L-метионин, L-аргинин, L-пролин или L-изолейцин, включающий стадии выращивания штамма бактерии *Escherichia coli* - продуцента L-аминокислоты, продукции и накопления L-аминокислоты в питательной среде и извлечения L-аминокислоты из культуральной жидкости, отличающийся тем, что в качестве штамма-продуцента используют штамм бактерии *Escherichia coli*, трансформированный плазмидой, содержащей ген, кодирующий пируваткарбоксилазу.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что ген, кодирующий пируваткарбоксилазу, получен из штамма бактерии, принадлежащего к роду *Bacillus*.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что ген, кодирующий пируваткарбоксилазу, введен в штамм вышеупомянутой бактерии в малом числе копий.

4. Штамм бактерии *Escherichia coli* MG442 (рMW119-*rusA*), трансформированный плазмидой, содержащей ген, кодирующий пируваткарбоксилазу - продуцент L-треонина и L-глутаминовой кислоты.

5. Штамм бактерии *Escherichia coli* 44

(pMW119-русА), трансформированный
плазмидой, содержащей ген, кодирующий

пируваткарбоксилазу, - продуцент
L-гомосерина.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

-8-

RU 2207376 C2

RU 2207376 C2

СПИСОК НУКЛЕОТИДНЫХ И АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Аджиномото Ко, Инк.

<120> Способ получения L-аминокислот методом ферментации

<130> OP877

<141> 1998-01-13

<160> 2

<170> Версия 2.0

<210> 1

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности:затравка

<400> 1

tggggcgggg ttagatctg gggg 24

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Искусственная последовательность

<220> <223> Описание искусственной последовательности:затравка

<400> 2 cttttacag aaaggtttag gaaa 24

<210> 3

<211> 3462

<212> ДНК

<213> Bacillus subtilis

<220>

<221> CDS

<222> (16)..(3459)

<400> 3

RU 2207376 C2

RU 2207376 C2

RU 2207376 C2

RU 2207376 C2

```

aaggggggaga aaagt ttg tct cag caa teg ata caa aaa gta tta gta gca 51
      Leu Ser Gin Gin Ser Ile Gin Lys Val Leu Val Ala
          1              5              10
aac agg gga gaa att gca ate cga ata ttc egg gcg tgt ace gag ttg 99
Asn Arg Gly Glu Ile Ala Ile Arg Ile Phe Arg Ala Cys Thr Glu Leu
          15              20              25
aat att cgt aca gtt gcg gtc tat tea aaa gaa gat tec ggt tec tac 147
Asn Ile Arg Thr Val Ala Val Tyr Ser Lys Glu Asp Ser Gly Ser Tyr
          30              35              40
cat egg tac aaa gcg gat gaa gca tac ttg gtc ggt gaa ggg aaa aaa 195
His Arg Tyr Lys Ala Asp Glu Ala Tyr Leu Val Gly Glu Gly Lys Lys
          45              50              55              60
ccg att gat get tac ctg gat att gaa ggt ate att gat att gcg aaa 243
Pro Ile Asp Ala Tyr Leu Asp Ile Glu Gly Ile Ile Asp Ile Ala Lys
          65              70              75
aga aac aaa gtc gat gca att cat ccg gga tac ggt ttc tta tct gaa 291
Arg Asn Lys Val Asp Ala Ile His Pro Gly Tyr Gly Phe Leu Ser Glu
          80              85              90
aat att cat ttt gcg aga cga tgt gaa gaa gaa ggc ate gta ttc ata 339
Asn Ile His Phe Ala Arg Arg Cys Glu Glu Glu Gly Ile Val Phe Ile
          95              100              105
ggg cca aaa tec gag cat ctc gat atg ttt ggt gac aag gta aaa gcg 387
Gly Pro Lys Ser Glu His Leu Asp Met Phe Gly Asp Lys Val Lys Ala
          110              115              120
cgt gag cag gca gaa aaa gcg gga atc ccc gtg att ccg gga agc gac 435
Arg Glu Gin Ala Glu Lys Ala Gly Ile Pro Val Ile Pro Gly Ser Asp
          125              130              135              140
ggt cct gcc gaa acg ctt gaa gcc gtc gaa caa ttt gga caa gct aac 483
Gly Pro Ala Glu Thr Leu Glu Ala Val Glu Gin Phe Gly Gin Ala Asn
          145              150              155
ggt tat ccg ate ate att aaa gcc tcg ctt ggc ggc ggc ggc cgc ggt 531
Gly Tyr Pro Ile Ile Ile Lys Ala Ser Leu Gly Gly Gly Gly Arg Gly
          160              165              170
atg cgg att gtc aga tct gaa agt gaa gtt aaa gaa gca tat gag cgt 579
Met Arg Ile Val Arg Ser Glu Ser Glu Val Lys Glu Ala Tyr Glu Arg
          175              180              185
gct aaa tea gag gcg aaa gca gcc ttt ggc aat gat gaa gtt tat gta 627
Ala Lys Ser Glu Ala Lys Ala Ala Phe Gly Asn Asp Glu Val Tyr Val
          190              195              200
gaa aaa tta att gag aat ccg aaa cat att gag gtt cag gtc att gga 675
Glu Lys Leu Ile Glu Asn Pro Lys His Ile Glu Val Gin Val Ile Gly
          205              210              215              220
gac aag cag ggc aat gtc gtc cat ctt ttc gag agg gat tgc tec gtt 723
Asp Lys Gin Gly Asn Val Val His Leu Phe Glu Arg Asp Cys Ser Val
          225              230              235

```

RU 2207376 C2

caa	aga	cgc	cat	caa	aaa	gtc	att	gaa	gtg	gcg	ccg	agt	gtc	tcg	ctg	771
Gin	Arg	Arg	His	Gin	Lys	Val	Ile	Glu	Val	Ala	Pro	Ser	Val	Ser	Leu	
			240													245
tca	cct	gaa	tta	agg	gac	caa	att	tgt	gag	gct	gca	gtt	gcg	ctt	gcc	819
Ser	Pro	Glu	Leu	Arg	Asp	Gin	Ile	Cys	Glu	Ala	Ala	Val	Ala	Leu	Ala	
			255													260
aaa	aat	gta	aac	tat	ata	aat	gcg	ggg	acg	gtc	gaa	ttc	ctt	gtt	gca	867
Lys	Asn	Val	Asn	Tyr	Ile	Asn	Ala	Gly	Thr	Val	Glu	Phe	Leu	Val	Ala	
			270													280
aac	aac	gag	ttc	tac	ttt	att	gaa	gta	aat	cct	cgc	gta	caa	gtt	gaa	915
Asn	Asn	Glu	Phe	Tyr	Phe	Ile	Glu	Val	Asn	Pro	Arg	Val	Gin	Val	Glu	
			285													290
cac	acg	ata	aca	gaa	atg	att	act	ggt	gtc	gat	att	gtt	caa	act	cag	963
His	Thr	Ile	Thr	Glu	Met	Ile	Thr	Gly	Val	Asp	Ile	Val	Gin	Thr	Gin	
																305
atc	ctt	gtt	gcc	caa	ggg	cac	age	ctt	cac	age	aaa	aaa	gta	aat	att	1011
Ile	Leu	Val	Ala	Gin	Gly	His	Ser	Leu	His	Ser	Lys	Lys	Val	Asn	Ile	
																320
cct	gag	caa	aag	gac	att	ttt	aca	atc	ggc	tat	gcc	att	cag	tca	cgg	1059
Pro	Glu	Gin	Lys	Asp	Ile	Phe	Thr	Ile	Gly	Tyr	Ala	Ile	Gin	Ser	Arg	
																335
gtt	acg	act	gag	gat	ccg	caa	aat	gat	ttc	atg	cct	gat	aca	gga	aaa	1107
Val	Thr	Thr	Glu	Asp	Pro	Gin	Asn	Asp	Phe	Met	Pro	Asp	Thr	Gly	Lys	
																350
ate	atg	get	tac	cgc	tea	ggc	ggc	ggt	ttt	ggt	gtc	cgt	ctt	gat	ace	1155
Ile	Met	Ala	Tyr	Arg	Ser	Gly	Gly	Gly	Phe	Gly	Val	Arg	Leu	Asp	Thr	
																365
gga	aac	agc	ttc	cag	ggc	gcc	gtg	atc	aca	cca	tac	tat	gat	tca	ctt	1203
Gly	Asn	Ser	Phe	Gin	Gly	Ala	Val	Ile	Thr	Pro	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Leu	
																370
ctc	gtt	aag	ctt	tca	act	tgg	gct	tta	acg	ttt	gaa	cag	gca	gct	gcc	1251
Leu	Val	Lys	Leu	Ser	Thr	Trp	Ala	Leu	Thr	Phe	Glu	Gin	Ala	Ala	Ala	
																400
aaa	atg	gtg	cga	aac	ctt	cag	gag	ttt	aga	ate	aga	ggc	ata	aaa	acg	1299
Lys	Met	Val	Arg	Asn	Leu	Gin	Glu	Phe	Arg	Ile	Arg	Gly	Ile	Lys	Thr	
																415
aac	att	ccg	ttc	ctt	gag	aac	gtt	gca	aag	cat	gag	aag	ttc	ctg	aca	1347
Asn	Ile	Pro	Phe	Leu	Glu	Asn	Val	Ala	Lys	His	Glu	Lys	Phe	Leu	Thr	
																430
ggg	caa	tat	gat	aca	tct	ttc	att	gat	aca	acg	cct	gaa	tta	ttt	aat	1395
Gly	Gin	Tyr	Asp	Thr	Ser	Phe	Ile	Asp	Thr	Thr	Pro	Glu	Leu	Phe	Asn	
																445
ttc	cct	aaa	caa	aaa	gac	cgc	gga	acg	aaa	atg	ctc	act	tac	atc	ggc	1443
Phe	Pro	Lys	Gin	Lys	Asp	Arg	Gly	Thr	Lys	Met	Leu	Thr	Tyr	Ile	Gly	
																465
																470

RU 2207376 C2

RU 2207376 C2

aat	gtg	aca	gtg	aac	ggc	ttc	cct	gga	atc	ggg	aaa	aaa	gaa	aaa	ccg	1491
Asn	Val	Thr	Val	Asn	Gly	Phe	Pro	Gly	Ile	Gly	Lys	Lys	Glu	Lys	Pro	
			480					485					490			
gcg	ttt	gac	aaa	ccg	tta	ggc	gta	aag	gta	gac	gtt	gat	cag	cag	cct	1539
Ala	Phe	Asp	Lys	Pro	Leu	Gly	Val	Lys	Val	Asp	Val	Asp	Gln	Gln	Pro	
			495				500					505				
gcc	aga	gga	aca	aag	caa	att	ctc	gat	gaa	aaa	ggg	gca	gaa	ggg	ctt	1587
Ala	Arg	Gly	Thr	Lys	Gln	Ile	Leu	Asp	Glu	Lys	Gly	Ala	Glu	Gly	Leu	
			510				515				520					
gca	aat	tgg	gtt	aag	gag	cag	aaa	tct	gtc	ctt	tta	act	gat	acg	aca	1635
Ala	Asn	Trp	Val	Lys	Glu	Gln	Lys	Ser	Val	Leu	Leu	Thr	Asp	Thr	Thr	
			525				530				535				540	
ttc	agg	gat	gcc	cac	caa	tcg	tta	ttg	gca	act	aga	atc	aga	tcg	cat	1683
Phe	Arg	Asp	Ala	His	Gln	Ser	Leu	Leu	Ala	Thr	Arg	Ile	Arg	Ser	His	
				545					550					555		
gat	ttg	aaa	aaa	atc	gca	aat	ccg	acg	gct	gcg	tta	tgg	cct	gaa	cta	1731
Asp	Leu	Lys	Lys	Ile	Ala	Asn	Pro	Thr	Ala	Ala	Leu	Trp	Pro	Glu	Leu	
			560					565					570			
ttc	agt	atg	gaa	atg	tgg	gga	ggc	gcg	acc	ttc	gat	gta	gcc	tac	cga	1779
Phe	Ser	Met	Glu	Met	Trp	Gly	Gly	Ala	Thr	Phe	Asp	Val	Ala	Tyr	Arg	
			575				580					585				
ttc	ctg	aaa	gaa	gat	ccg	tgg	aaa	cgt	ttg	gaa	gat	ctt	cgc	aaa	gaa	1827
Phe	Leu	Lys	Glu	Asp	Pro	Trp	Lys	Arg	Leu	Glu	Asp	Leu	Arg	Lys	Glu	
			590				595				600					
gtg	ccg	aat	acc	tta	ttc	cag	atg	ttg	ctt	cgc	tca	tca	aat	gcg	gtc	1875
Val	Pro	Asn	Thr	Leu	Phe	Gln	Met	Leu	Leu	Arg	Ser	Ser	Asn	Ala	Val	
			605			610				615					620	
ggc	tat	acg	aat	tat	ccg	gac	aat	gtg	att	aaa	gaa	ttt	gtg	aag	caa	1923
Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Pro	Asp	Asn	Val	Ile	Lys	Glu	Phe	Val	Lys	Gln	
			625					630					635			
tca	gct	caa	tec	ggt	att	gat	gtg	ttt	cgt	att	ttc	gac	agc	tta	aac	1971
Ser	Ala	Gln	Ser	Gly	Ile	Asp	Val	Phe	Arg	Ile	Phe	Asp	Ser	Leu	Asn	
			640					645					650			
tgg	gta	aaa	ggg	atg	acg	tta	gcc	att	gat	gct	gtt	agg	gat	acc	ggc	2019
Trp	Val	Lys	Gly	Met	Thr	Leu	Ala	Ile	Asp	Ala	Val	Arg	Asp	Thr	Gly	
			655				660					665				
aaa	gtg	gca	gaa	gct	gcg	att	tgt	tat	acg	gga	gat	atc	ctt	gac	aag	2067
Lys	Val	Ala	Glu	Ala	Ala	Ile	Cys	Tyr	Thr	Gly	Asp	Ile	Leu	Asp	Lys	
			670			675					680					
aac	cgg	acg	aag	tac	gac	ctt	gca	tat	tat	aca	tcg	atg	gcg	aag	gag	2115
Asn	Arg	Thr	Lys	Tyr	Asp	Leu	Ala	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Met	Ala	Lys	Glu	
			685			690				695				700		
ctt	gag	gcg	gee	gga	gcc	cat	att	ctc	ggg	att	aaa	gat	atg	gca	ggg	2163
Leu	Glu	Ala	Ala	Gly	Ala	His	Ile	Leu	Gly	Ile	Lys	Asp	Met	Ala	Gly	
				705					710					715		

RU 2207376 C2

RU 2207376 C2

```

ctg tta aaa ccg cag gct gca tat gag ctc gtt tct gcg ttg aaa gaa 2211
Leu Leu Lys Pro Gin Ala Ala Tyr Glu Leu Val Ser Ala Leu Lys Glu
      720      725      730
acg atc gac att ccg gtt cac ctt cat acg cat gat acg agc gga aac 2259
Thr Ile Asp Ile Pro Val His Leu His Thr His Asp Thr Ser Gly Asn
      735      740      745
ggt att tat atg tat gcg aaa gct gtt gaa gcc ggc gtt gat atc ata 2307
Gly Ile Tyr Met Tyr Ala Lys Ala Val Glu Ala Gly Val Asp Ile Ile
      750      755      760
gac gtg gcg gtc agc tca atg gcg gga tta acg tca cag cct agc gcg 2355
Asp Val Ala Val Ser Ser Met Ala Gly Leu Thr Ser Gin Pro Ser Ala
      765      770      775      780
agc gga ttt tat cat gcg atg gaa ggc aac gac cgc cgt ccg gaa atg 2403
Ser Gly Phe Tyr His Ala Met Glu Gly Asn Asp Arg Arg Pro Glu Met
      785      790      795
aat gtc caa ggc gtt gaa ttg ctg tcc caa tat tgg gag tcg gtg cgt 2451
Asn Val Gin Gly Val Glu Leu Leu Ser Gin Tyr Trp Glu Ser Val Arg
      800      805      810
aaa tat tat agt gaa ttt gaa agc gga atg aag tct ccg cat act gaa 2499
Lys Tyr Tyr Ser Glu Phe Glu Ser Gly Met Lys Ser Pro His Thr Glu
      815      820      825
att tat gaa cac gaa atg cca ggg ggc caa tac agc aac ctg cag cag 2547
Ile Tyr Glu His Glu Met Pro Gly Gly Gln Tyr Ser Asn Leu Gln Gln
      830      835      840
caa gcc aag gga gta ggc ctt ggc gac cgc tgg aac gaa gtc aag gaa 2595
Gin Ala Lys Gly Val Gly Leu Gly Asp Arg Trp Asn Glu Val Lys Glu
      845      850      855      860
atg tac aga cgc gtg aac gat atg ttc ggt gac atc gtc aag gta acg 2643
Met Tyr Arg Arg Val Asn Asp Met Phe Gly Asp Ile Val Lys Val Thr
      865      870      875
cct tcc tea aaa gta gtc gga gat atg gca ctc tac atg gtg caa aac 2691
Pro Ser Ser Lys Val Val Gly Asp Met Ala Leu Tyr Met Val Gln Asn
      880      885      890
aat ctg act gaa aaa gac gtt tac gaa aaa ggt gaa tct tta gat ttc 2739
Asn Leu Thr Glu Lys Asp Val Tyr Glu Lys Gly Glu Ser Leu Asp Phe
      895      900      905
cct gat tct gtc gtg gag ctt ttt aaa gga aat atc ggc cag cct cat 2787
Pro Asp Ser Val Val Glu Leu Phe Lys Gly Asn Ile Gly Gln Pro His
      910      915      920
ggc gga ttc cca gaa aaa ctg caa aag ctg atc tta aaa ggg cag gag 2835
Gly Gly Phe Pro Glu Lys Leu Gin Lys Leu Ile Leu Lys Gly Gln Glu
      925      930      935      940
ccg att aca gtc aga ccg ggc gaa ctg ctt gag ccg gtg tca ttt gaa 2883
Pro Ile Thr Val Arg Pro Gly Glu Leu Leu Glu Pro Val Ser Phe Glu
      945      950      955

```

RU 2207376 C2

RU 2207376 C2

RU 2207376 C2

gcg atc aaa cag gaa ttt aaa gag cag cat aac ttg gaa att tca gat 2931
 Ala Ile Lys Gin Glu Phe Lys Glu Gin His Asn Leu Glu Ile Ser Asp
 960 965 970
 cag gat gct gtg gca tat gcc ctt tat cct aaa gtc ttc act gat tat 2979
 Gln Asp Ala Val Ala Tyr Ala Leu Tyr Pro Lys Val Phe Thr Asp Tyr
 975 980 985
 gtg aaa acg aca gaa agc tat gga gac atc tcg gta tta gat aca ccg 3027
 Val Lys Thr Thr Glu Ser Tyr Gly Asp Ile Ser Val Leu Asp Thr Pro
 990 995 1000
 aca ttc ttc tac ggt atg aca tta ggt gaa gag ata gaa gtt gaa att 3075
 Thr Phe Phe Tyr Gly Met Thr Leu Gly Glu Glu Ile Glu Val Glu Ile
 1005 1010 1015 1020
 gag cgc ggc aaa acg ctg atc gtt aag ctg att tca atc ggt gag cct 3123
 Glu Arg Gly Lys Thr Leu Ile Val Lys Leu Ile Ser Ile Gly Glu Pro
 1025 1030 1035
 cag cct gat gcc ace cgc gtc gtt tat ttc gaa ctc aac ggg cag ccg 3171
 Gln Pro Asp Ala Thr Arg Val Val Tyr Phe Glu Leu Asn Gly Gln Pro
 1040 1045 1050
 cgt gaa gta gtc att aaa gat gaa agc att aag tct tcc gtt cag gaa 3219
 Arg Glu Val Val Ile Lys Asp Glu Ser Ile Lys Ser Ser Val Gln Glu
 1055 1060 1065
 agg ctg aaa gca gac cgg aca aat cca agc cac ate gca gct tcc atg 3267
 Arg Leu Lys Ala Asp Arg Thr Asn Pro Ser His Ile Ala Ala Ser Met
 1070 1075 1080
 cct gga aca gtt att aag gta ttg gct gaa gca ggc aca aaa gtc aat 3315
 Pro Gly Thr Val Ile Lys Val Leu Ala Glu Ala Gly Thr Lys Val Asn
 1085 1090 1095 1100
 aaa ggt gat cat ttg atg att aat gaa gcg atg aaa atg gaa aca acg 3363
 Lys Gly Asp His Leu Met Ile Asn Glu Ala Met Lys Met Glu Thr Thr
 1105 1110 1115
 gtt cag gcg cct ttc tca gga aca atc aag cag gtt cat gtg aaa aat 3411
 Val Gln Ala Pro Phe Ser Gly Thr Ile Lys Gln Val His Val Lys Asn
 1120 1125 1130
 ggt gag ccg atc caa acg gga gat ctg ctc ctt gaa att gaa aaa gca 3459
 Gly Glu Pro Ile Gln Thr Gly Asp Leu Leu Leu Glu Ile Glu Lys Ala
 1135 1140 1145
 taa 3462

<210>4
 <211> 1148
 <212>PRT
 <213> Bacillus subtilis
 <400> 4

Leu Ser Gin Gin Ser Ile Gin Lys Val Leu Val Ala Asn Arg Gly Glu
 1 5 10 15
 Ile Ala Ile Arg Ile Phe Arg Ala Cys Thr Glu Leu Asn Ile Arg Thr
 20 25 30

RU 2207376 C2

RU ? 2 0 7 3 7 6 C 2

Val	Ala	Val	Tyr	Ser	Lys	Glu	Asp	Ser	Gly	Ser	Tyr	His	Arg	Tyr	Lys
			35					40					45		
Ala	Asp	Glu	Ala	Tyr	Leu	Val	Gly	Glu	Gly	Lys	Lys	Pro	Ile	Asp	Ala
		50					55					60			
Tyr	Leu	Asp	Ile	Glu	Gly	Ile	Ile	Asp	Ile	Ala	Lys	Arg	Asn	Lys	Val
	65					70					75				
Asp	Ala	Ile	His	Pro	Gly	Tyr	Gly	Phe	Leu	Ser	Glu	Asn	Ile	His	Phe
80					85					90					95
Ala	Arg	Arg	Cys	Glu	Glu	Glu	Gly	Ile	Val	Phe	Ile	Gly	Pro	Lys	Ser
				100					105					110	
Glu	His	Leu	Asp	Met	Phe	Gly	Asp	Lys	Val	Lys	Ala	Arg	Glu	Gln	Ala
			115					120					125		
Glu	Lys	Ala	Gly	Ile	Pro	Val	Ile	Pro	Gly	Ser	Asp	Gly	Pro	Ala	Glu
		130					135					140			
Thr	Leu	Glu	Ala	Val	Glu	Gln	Phe	Gly	Gln	Ala	Asn	Gly	Tyr	Pro	Ile
	145					150					155				
Ile	Ile	Lys	Ala	Ser	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Arg	Gly	Met	Arg	Ile	Val
160					165					170					175
Arg	Ser	Glu	Ser	Glu	Val	Lys	Glu	Ala	Tyr	Glu	Arg	Ala	Lys	Ser	Glu
				180					185					190	
Ala	Lys	Ala	Ala	Phe	Gly	Asn	Asp	Glu	Val	Tyr	Val	Glu	Lys	Leu	Ile
			195					200					205		
Glu	Asn	Pro	Lys	His	Ile	Glu	Val	Gln	Val	Ile	Gly	Asp	Lys	Gln	Gly
		210					215					220			
Asn	Val	Val	His	Leu	Phe	Glu	Arg	Asp	Cys	Ser	Val	Gln	Arg	Arg	His
	225					230					235				
Gln	Lys	Val	Ile	Glu	Val	Ala	Pro	Ser	Val	Ser	Leu	Ser	Pro	Glu	Leu
240					245					250					255
Arg	Asp	Gln	Ile	Cys	Glu	Ala	Ala	Val	Ala	Leu	Ala	Lys	Asn	Val	Asn
				260					265					270	
Tyr	Ile	Asn	Ala	Gly	Thr	Val	Glu	Phe	Leu	Val	Ala	Asn	Asn	Glu	Phe
			275					280					285		
Tyr	Phe	Ile	Glu	Val	Asn	Pro	Arg	Val	Gln	Val	Glu	His	Thr	Ile	Thr
		290					295					300			
Glu	Met	Ile	Thr	Gly	Val	Asp	Ile	Val	Gln	Thr	Gln	Ile	Leu	Val	Ala
	305					310					315				
Gln	Gly	His	Ser	Leu	His	Ser	Lys	Lys	Val	Asn	Ile	Pro	Glu	Gln	Lys
320					325					330					335
Asp	Ile	Phe	Thr	Ile	Gly	Tyr	Ala	Ile	Gln	Ser	Arg	Val	Thr	Thr	Glu
				340					345					350	
Asp	Pro	Gln	Asn	Asp	Phe	Met	Pro	Asp	Thr	Gly	Lys	Ile	Met	Ala	Tyr
			355					360					365		
Arg	Ser	Gly	Gly	Gly	Phe	Gly	Val	Arg	Leu	Asp	Thr	Gly	Asn	Ser	Phe
		370					375					380			
Gln	Gly	Ala	Val	Ile	Thr	Pro	Tyr	T							

RU 2207376 C2

Asn	Leu	Gln	Glu	Phe	Arg	Ile	Arg	Gly	Ile	Lys	Thr	Asn	Ile	Pro	Phe
				420					425					430	
Leu	Glu	Asn	Val	Ala	Lys	His	Glu	Lys	Phe	Leu	Thr	Gly	Gln	Tyr	Asp
			435					440					445		
Thr	Ser	Phe	Ile	Asp	Thr	Thr	Pro	Glu	Leu	Phe	Asn	Phe	Pro	Lys	Gln
		450					455					460			
Lys	Asp	Arg	Gly	Thr	Lys	Met	Leu	Thr	Tyr	Ile	Gly	Asn	Val	Thr	Val
	465					470					475				
Asn	Gly	Phe	Pro	Gly	Ile	Gly	Lys	Lys	Glu	Lys	Pro	Ala	Phe	Asp	Lys
480					485						490				495
Pro	Leu	Gly	Val	Lys	Val	Asp	Val	Asp	Gln	Gln	Pro	Ala	Arg	Gly	Thr
				500					505					510	
Lys	Gln	Ile	Leu	Asp	Glu	Lys	Gly	Ala	Glu	Gly	Leu	Ala	Asn	Trp	Val
			515					520					525		
Lys	Glu	Gln	Lys	Ser	Val	Leu	Leu	Thr	Asp	Thr	Thr	Phe	Arg	Asp	Ala
		530						535					540		
His	Gln	Ser	Leu	Leu	Ala	Thr	Arg	Ile	Arg	Ser	His	Asp	Leu	Lys	Lys
	545					550					555				560
Ile	Ala	Asn	Pro	Thr	Ala	Ala	Leu	Trp	Pro	Glu	Leu	Phe	Ser	Met	Glu
				565					570					575	
Met	Trp	Gly	Gly	Ala	Thr	Phe	Asp	Val	Ala	Tyr	Arg	Phe	Leu	Lys	Glu
			580					585					590		
Asp	Pro	Trp	Lys	Arg	Leu	Glu	Asp	Leu	Arg	Lys	Glu	Val	Pro	Asn	Thr
		595					600					605			
Leu	Phe	Gln	Met	Leu	Leu	Arg	Ser	Ser	Asn	Ala	Val	Gly	Tyr	Thr	Asn
	610					615					620				
Tyr	Pro	Asp	Asn	Val	Ile	Lys	Glu	Phe	Val	Lys	Gln	Ser	Ala	Gln	Ser
625				630						635					640
Gly	Ile	Asp	Val	Phe	Arg	Ile	Phe	Asp	Ser	Leu	Asn	Trp	Val	Lys	Gly
			645						650					655	
Met	Thr	Leu	Ala	Ile	Asp	Ala	Val	Arg	Asp	Thr	Gly	Lys	Val	Ala	Glu
			660						665					670	
Ala	Ala	Ile	Cys	Tyr	Thr	Gly	Asp	Ile	Leu	Asp	Lys	Asn	Arg	Thr	Lys
		675					680						685		
Tyr	Asp	Leu	Ala	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Met	Ala	Lys	Glu	Leu	Glu	Ala	Ala
		690				695					700				
Gly	Ala	His	Ile	Leu	Gly	Ile	Lys	Asp	Met	Ala	Gly	Leu	Leu	Lys	Pro
705				710						715					720
Gln	Ala	Ala	Tyr	Glu	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Lys	Glu	Thr	Ile	Asp	Ile
				725					730					735	
Pro	Val	His	Leu	His	Thr	His	Asp	Thr	Ser	Gly	Asn	Gly	Ile	Tyr	Met
			740					745					750		
Tyr	Ala	Lys	Ala	Val	Glu	Ala	Gly	Val	Asp	Ile	Ile	Asp	Val	Ala	Val
		755					760					765			
Ser	Ser	Met	Ala	Gly	Leu	Thr	Ser	Gln	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Phe	Tyr
		770				775					780				
His	Ala	Met	Glu	Gly	Asn	Asp	Arg	Arg	Pro	Glu	Met	Asn	Val	Gln	Gly
785					790					795					800

RU 2207376 C2

RU 2207376 C2

Val	Glu	Leu	Leu	Ser	Gln	Tyr	Trp	Glu	Ser	Val	Arg	Lys	Tyr	Tyr	Ser	
				805					810					815		
Glu	Phe	Glu	Ser	Gly	Met	Lys	Ser	Pro	His	Thr	Glu	Ile	Tyr	Glu	His	
			820					825					830			
Glu	Met	Pro	Gly	Gly	Gln	Tyr	Ser	Asn	Leu	Gln	Gln	Gln	Ala	Lys	Gly	
		835					840					845				
Val	Gly	Leu	Gly	Asp	Arg	Trp	Asn	Glu	Val	Lys	Glu	Met	Tyr	Arg	Arg	
	850					855					860					
Val	Asn	Asp	Met	Phe	Gly	Asp	Ile	Val	Lys	Val	Thr	Pro	Ser	Ser	Lys	
865					870					875					880	
Val	Val	Gly	Asp	Met	Ala	Leu	Tyr	Met	Val	Gln	Asn	Asn	Leu	Thr	Glu	
			885						890					895		
Lys	Asp	Val	Tyr	Glu	Lys	Gly	Glu	Ser	Leu	Asp	Phe	Pro	Asp	Ser	Val	
		900						905					910			
Val	Glu	Leu	Phe	Lys	Gly	Asn	Ile	Gly	Gln	Pro	His	Gly	Gly	Phe	Pro	
	915						920					925				
Glu	Lys	Leu	Gln	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Gly	Gln	Glu	Pro	Ile	Thr	Val	
	930					935					940					
Arg	Pro	Gly	Glu	Leu	Leu	Glu	Pro	Val	Ser	Phe	Glu	Ala	Ile	Lys	Gln	
945					950					955					960	
Glu	Phe	Lys	Glu	Gln	His	Asn	Leu	Glu	Ile	Ser	Asp	Gln	Asp	Ala	Val	
			965						970					975		
Ala	Tyr	Ala	Leu	Tyr	Pro	Lys	Val	Phe	Thr	Asp	Tyr	Val	Lys	Thr	Thr	
		980						985					990			
Glu	Ser	Tyr	Gly	Asp	Ile	Ser	Val	Leu	Asp	Thr	Pro	Thr	Phe	Phe	Tyr	
	995						1000					1005				
Gly	Met	Thr	Leu	Gly	Glu	Glu	Ile	Glu	Val	Glu	Ile	Glu	Arg	Gly	Lys	
	1010					1015					1020					
Thr	Leu	Ile	Val	Lys	Leu	Ile	Ser	Ile	Gly	Glu	Pro	Gln	Pro	Asp	Ala	
1025					1030					1035					1040	
Thr	Arg	Val	Val	Tyr	Phe	Glu	Leu	Asn	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Val	Val	
			1045						1050					1055		
Ile	Lys	Asp	Glu	Ser	Ile	Lys	Ser	Ser	Val	Gln	Glu	Arg	Leu	Lys	Ala	
		1060						1065					1070			
Asp	Arg	Thr	Asn	Pro	Ser	His	Ile	Ala	Ala	Ser	Met	Pro	Gly	Thr	Val	
		1075					1080					1085				
Ile	Lys	Val	Leu	Ala	Glu	Ala	Gly	Thr	Lys	Val	Asn	Lys	Gly	Asp	His	
	1090					1095					1100					
Leu	Met	Ile	Asn	Glu	Ala	Met	Lys	Met	Glu	Thr	Thr	Val	Gln	Ala	Pro	
1105					1110					1115					1120	
Phe	Ser	Gly	Thr	Ile	Lys	Gln	Val	His	Val	Lys	Asn	Gly	Glu	Pro	Ile	
			1125						1130					1135		
Gln	Thr	Gly	Asp	Leu	Leu	Leu	Glu	Ile	Glu	Lys	Ala					
			1140					1145								

RU 2207376 C2

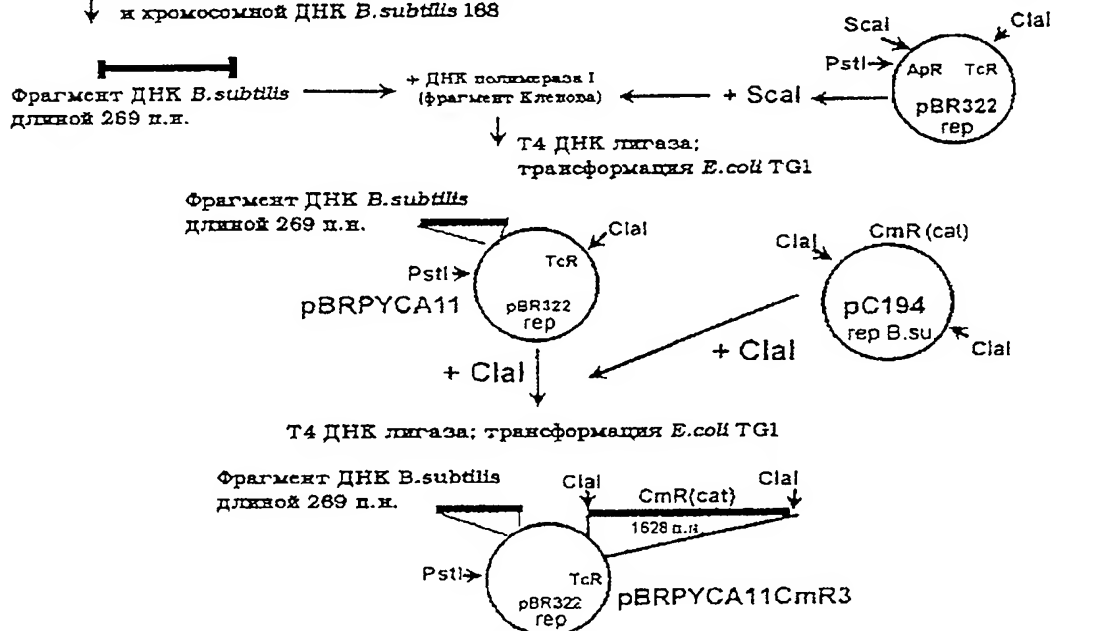
Номер Клона	MG442 (контроль)		MG442 (рМW119-русА)	
	L-Thr (г/л)	L-Glu (г/л)	L-Thr (г/л)	L-Glu (г/л)
1	5,5	9,5	7,8	12,3
2	3,2	7,1	9,8	12,3
3	3,6	7,1	9,4	13,3
4	3,4	8,9	9,8	11,8
5	3,3	8,9	9,8	11,8
6	4,8	7,3	9,9	11,8
7	3,3	7,0	10,0	10,7
8	4,7	8,3	10,0	10,4
9	3,2	7,3	9,7	11,2
10	2,6	4,1	10,0	10,7
Среднее	3,8	7,4	9,6	11,6

RU 2207376 C2

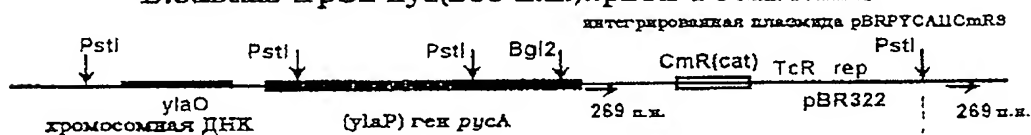
RU 2207376 C2

Конструирование штамма-реципиента *B.subtilis* *pusA::KmR* для клонирования

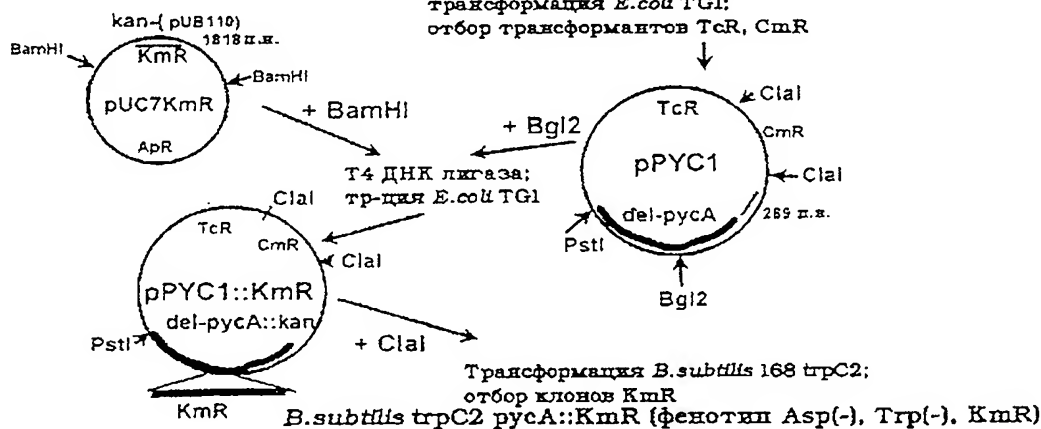
ПЦР с олигонуклеотидами 5'-GATATAAGGGGACTTCAGAG и 5'-GGCGCTTTATGCGTTTCAATC
↓ и хромосомной ДНК *B.subtilis* 168



Трансформация *B.subtilis* 168 *trpC2* и отбор клонов CmR *B.subtilis* *trpC2* *xyz*(269 п.н.):pBRPYCA11CmR3




Выделение хромосомной ДНК; разрезание с помощью PstI;
самолитигрование с помощью T4 ДНК лигазы;
трансформация *E.coli* TG1;
отбор трансформантов TcR, CmR



Фиг. 1

RU 2207376 C2

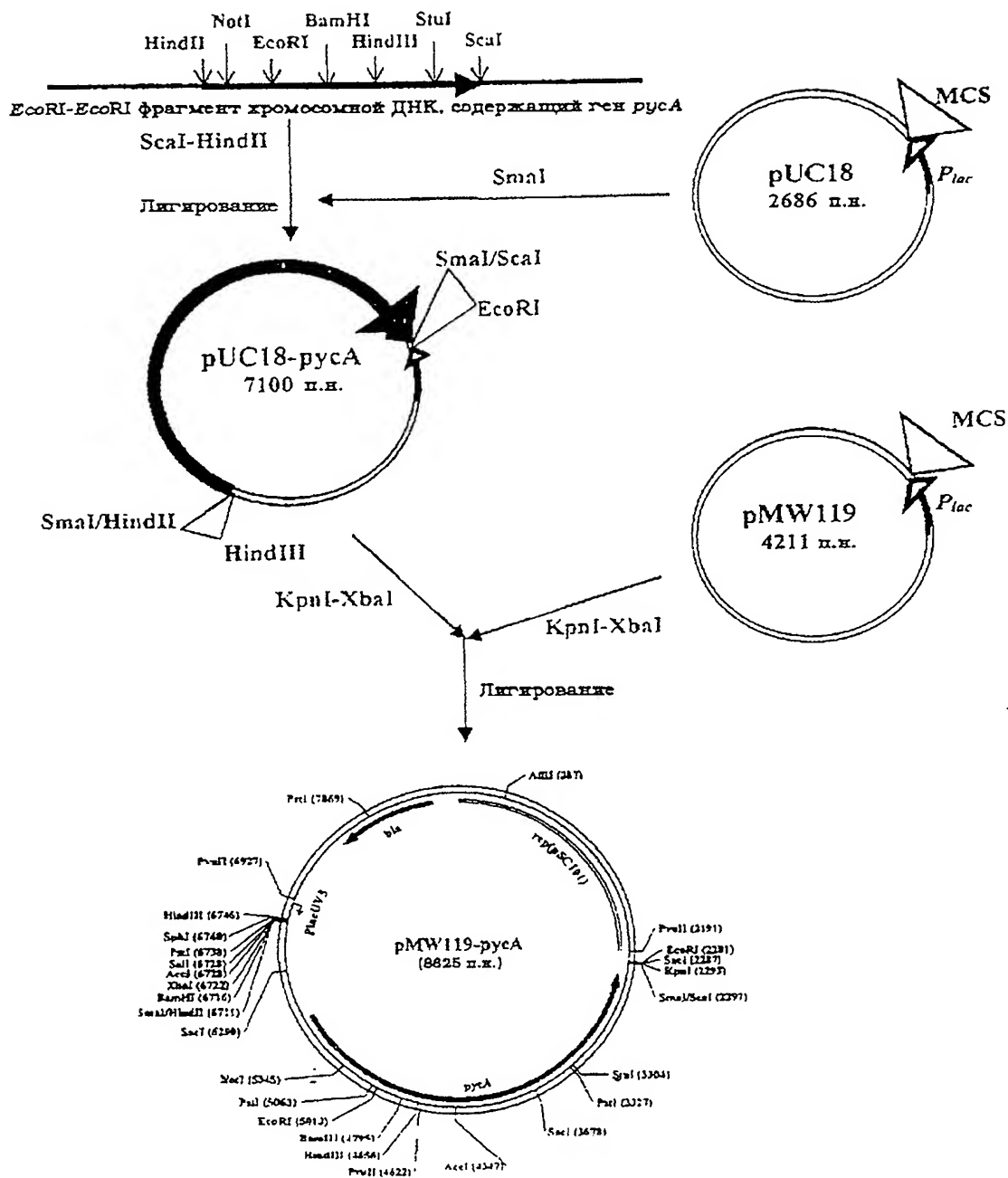
RU ? 2 0 7 3 7 6 C 2

090/120 

2008 06/16 MON 18:40 FAX 03 3669 6573 秀和特許事務所 → OBLON 米国

Фиг. 2





Фиг. 3